



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 147 149**

⑫ Número de solicitud: 009802442

⑬ Int. Cl.⁷: C12Q 1/06

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **20.11.1998**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2000**

Fecha de concesión: **29.01.2001**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.03.2001**

⑱ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.03.2001

⑲ Titular/es: **Consejo Superior de
Investigaciones Científicas.
Serrano, 113
28006 Madrid, ES**

⑳ Inventor/es:
**Montero de Espinosa Freijo, Francisco;
Maestre Vera, Juan Ramón y
Tardajos Rodríguez, Gloria**

㉑ Agente: **No consta**

㉒ Título: **Procedimiento para la detección del crecimiento de microorganismos en fluidos biológicos y muestras clínicas mediante ultrasonidos.**

㉓ Resumen:

Procedimiento para la detección del crecimiento de microorganismos en fluidos biológicos y muestras clínicas mediante ultrasonidos.

El procedimiento consiste en la medida automática de la velocidad de propagación de una señal impulsiva con una frecuencia central de 5 MHz a través de un recipiente estéril que contiene un medio de cultivo líquido al que previamente se le ha inoculado una muestra clínica de sangre, orina u otro fluido orgánico. El recipiente y la muestra líquida han de permanecer a una temperatura controlada y fija. En condiciones estándar se fija en 35°C. La técnica de medida puede utilizar bien la configuración de transmisión - through-transmission- con dos transductores piezoeléctricos enfrentados, bien la de pulso-eco - pulse-echo- con un sólo transductor y un reflector enfrentado y paralelo a la superficie de emisión del mismo. El pulso ultrasónico es procesado después de atravesar el recipiente, calculando por procedimientos digitales la diferencia en tiempo entre la señal de disparo y la llegada de dicho pulso.

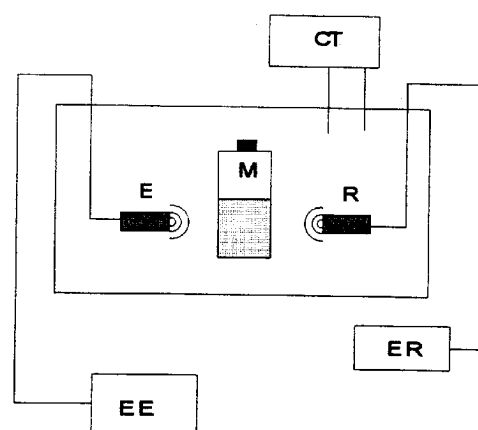


Figura 1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 147 149 B1

DESCRIPCION

Procedimiento para la detección del crecimiento de microorganismos en fluidos biológicos y muestras clínicas mediante ultrasonidos.

Sector de la técnica

Se dirige al sector de la Instrumentación Médica. El campo específico es la Analítica Clínica y la Microbiología.

Estado de la técnica

Las infecciones bacterianas, lejos de su erradicación, siguen suponiendo un inconveniente sanitario de primer orden a nivel mundial. Entre ellas, la infección hospitalaria (nosocomial) es un problema frecuente que afecta a cerca del 10 % de los pacientes ingresados en los hospitales, aumentando la mortalidad y prolongando sus días de estancia en él. Las infecciones hospitalarias más frecuentes son: las urinarias, seguidas por las infecciones de herida quirúrgica, infecciones respiratorias y bacteriemias primarias.

Todas ellas, en mayor o menor medida, pueden dar lugar a bacteriemia secundaria (presencia de bacterias en sangre), sepsis y shock con fallo multiorgánico y elevada mortalidad.

La bacteriemia es la expresión más neta y clara de la infección bacteriana de cualquier tipo y constituye su manifestación más grave. En nuestro país, la mayoría de los centros aportan actualmente cifras que oscilan entre 5 y 30 casos de bacteriemia por cada 1.000 pacientes hospitalizados.

La expresión clínica del paciente crítico con bacteriemia no es específica, por lo que resulta de utilidad adoptar como sistemática la obtención de múltiples muestras de sangre para cultivo (hemocultivo) con el fin de documentar su existencia y adoptar las medidas terapéuticas oportunas en cada caso. En este sentido, cada laboratorio debe elegir la estrategia más idónea enfocada a *mejorar la precocidad en la detección e identificación de bacterias y otros microorganismos en hemocultivo*, sin abandono de las técnicas convencionales.

Los procedimientos técnicos - actualmente disponibles en los laboratorios de microbiología - tienen por objeto detectar la presencia de estos microorganismos en sangre, líquidos corporales y otras muestras clínicas, proceder a su identificación morfológica, bioquímica, serológica, etc y llevar a cabo pruebas de sensibilidad frente a los antibióticos.

Una característica significativa de la mayoría de las bacteriemias es el bajo número de unidades formadoras de colonias (ufc) encontradas por mililitro de sangre. Así, en endocarditis estreptocócica y estafilocócica se obtienen recuentos entre 1-30 ufc/ml de sangre en el 54 % y 70 % de los casos respectivamente. De este hecho se deduce que hay una relación directa entre el volumen de sangre procesado y los resultados del cultivo. Por tanto, el motivo de tomar dos o tres hemocultivos espaciados es aumentar la probabilidad de detectar bacteriemias que son frecuentemente intermitentes y el extraer 10 o más mililitros de sangre por hemocultivo se basa en la mayor probabilidad de detectar pequeñas cantidades de microorganismos que son a menudo responsables de las bacteriemias.

En la práctica de hemocultivos se utilizan frascos estériles con medios líquidos de composición variable, donde se inoculan de 5 a 10 ml de sangre del paciente, en condiciones aerobias y anaerobias, se incuban en estufas a 35-37 grados centígrados y se mantienen en estas condiciones durante un período variable de uno a veinte días, en función del agente infeccioso esperado. Las bacterias más frecuentes se detectan en un plazo de 24-72 horas, mientras que los microorganismos de crecimiento lento precisan períodos de incubación prolongados.

Para la detección de microorganismos a partir de líquidos corporales, como sangre, se utilizan distintos procedimientos:

- 1.- En medios difásicos sólido-líquido: se observan colonias a simple vista creciendo en la superficie del medio sólido, identificándolas posteriormente. Dificultades: tardan en aparecer y no siempre son visibles. Ventajas: no se abren los frascos hasta no tener constancia de la presencia de gérmenes, se evitan manipulaciones innecesarias y contaminaciones.
- 2.- En medios líquidos: se observan diariamente los frascos buscando indicios de crecimiento, de forma macroscópica o radiométrica. Con objeto de aumentar la sensibilidad y rapidez en la detección se utilizan, entre otros, los siguientes sistemas:
 - * Producción de CO₂ resultado del metabolismo en los frascos donde existan microorganismos. Para ello se introduce una aguja en el frasco para extraer gas y medir la concentración de CO₂ por espectrofotometría de infrarrojos. Riesgos de contaminación. En otros la formación de CO₂ se detecta por fluorescencia, medible por un fotodetector
 - * Otros sistemas (tecnología H.F.T) detectan el crecimiento bacteriano por variaciones del pH o modificaciones del potencial de oxido-reducción. Presentan la ventaja de lectura no invasiva y la desventaja del alto coste.
 - * Extracción de un pequeño volumen de líquido contenido en los frascos y examen microscópico tras tinción con colorantes Gram, Ziehl, Naranja de acridina, etc
 - * Pases a ciegas del caldo a diferentes medios de cultivo sólido. Desventaja: los subcultivos rutinarios son costosos y consumen mucho tiempo y material.

Los sistemas mencionados plantean problemas por:

- * Baja sensibilidad para detectar ciertos agentes
- * Demora en los resultados preliminares y finales

- * Contaminación/Problemas de interpretación
- * Coste elevado

Descripción de la invención

Problema técnico planteado

Es bien conocida la posibilidad de medir parámetros físico-químicos de líquidos mediante técnicas ultrasónicas - Espectroscopía Ultrasónica-. Los parámetros típicamente medidos son la velocidad de propagación y la atenuación. La medida de la velocidad de propagación ultrasónica en líquidos, ha sido objeto de atención en los últimos quince años, existiendo técnicas patentadas de medida no automática. La técnica que se presenta en la invención es de tipo automático alcanzando un alto grado de precisión en condiciones óptimas de control de parámetros de laboratorio - de 1 mm/s en medida de velocidad lo que implica 1ppm del valor absoluto de la velocidad-, siendo por tanto extremadamente sensible a pequeños cambios en concentración o estructura del medio líquido. La atenuación es medida en forma relativa a lo largo del proceso de crecimiento celular. El problema técnico es pues la medida automática del tiempo de vuelo de una señal ultrasónica con precisión superior a 1ns junto con la medida relativa de atenuación.

Breve descripción de la invención

El procedimiento consiste en la medida automática de la velocidad de propagación de una señal impulsiva con una frecuencia central de 5 MHz a través de un recipiente estéril que contiene un medio de cultivo líquido al que previamente se le ha inoculado una muestra clínica de sangre, orina u otro fluido orgánico.

El recipiente y la muestra líquida han de permanecer a una temperatura controlada y fija. En condiciones estándar se fija en 35 °C.

Las técnica de medida puede utilizar bien la configuración de transmisión - through-transmission- con dos transductores piezoeléctricos enfrentados, bien la de pulso-eco - pulse-echo- con un sólo transductor y un reflector enfrentado y paralelo a la superficie de emisión del mismo.

El pulso ultrasónico es procesado después de atravesar el recipiente, calculando por procedimientos digitales la diferencia en tiempo entre la señal de disparo y la llegada de dicho pulso.

Descripción detallada de la invención

Para diseñar y realizar una técnica de medida automática de velocidad de ondas ultrasónicas a través de fluidos, se han de definir dos parámetros esenciales: la frecuencia, la atenuación del medio y la geometría del problema.

La frecuencia está relacionada con la resolución de la medida. Cuanto mayor sea la frecuencia, más precisión en la detección de las interfaces líquido-recipiente y de los puntos de medida. Por otro lado, el efecto de colimación de haz necesario para evitar ecos espúreos y pérdidas de difracción también es favorecido por las altas frecuencias. El inconveniente de subir la frecuencia es el aumento de la atenuación, que está relacionado con el cuadrado de la frecuencia.

La geometría del problema viene condicionada por la de los recipientes estériles utilizados. De hecho la célula de medida se diseña en función

de dichos recipientes cuyo único condicionante es que tengan al menos dos lados planos. El material de los mismos puede ser cualquiera - plástico, vidrio...-.

El sistema consiste específicamente en una célula ultrasónica termostatzada con precisión de 0.001 °C, un generador eléctrico de banda ancha y una etapa de recepción y procesado digital de señal.- Figura 1.- El procedimiento consiste en la medición automática del tiempo de llegada de un impulso ultrasónico que partiendo del transductor emisor (E) llega al transductor receptor (R) tras atravesar el recipiente con la muestra de fluido en estudio tiempo de vuelo T-. Este tiempo es registrado a intervalos fijos y presentado en forma gráfica con respecto al tiempo de toma de datos. La toma de datos se mantiene hasta que se produce la decisión de detección positiva o negativa.

Un ejemplo del resultado obtenido puede verse en la Figura 2. Se seleccionó el microorganismo: Staphylococcus epidermidis por ser un germen habitual en clínica. El proceso de medida consiste en primer lugar en la preparación de un inóculo a partir de una suspensión bacteriana de concentración definida, de ella se transfiere al frasco de cultivo de forma aséptica controlando la concentración bacteriana final introduciendo el frasco en el baño termostatzado de geometría adecuada para el proceso de medida. A partir de la inoculación, comienza la toma de datos. En la figura -donde T es el tiempo a lo largo del cual se toman los datos y R es la inversa de la medida del tiempo de vuelo- puede apreciarse el crecimiento exponencial esperado.

Descripción detallada de los dibujos

Figura 1.

En la figura se representa un esquema general del procedimiento. E es el transductor piezoeléctrico emisor. R es el transductor piezoeléctrico receptor. EE representa a la electrónica de excitación que normalmente es un generador de impulsos de banda ancha. ER es la electrónica de recepción que incluye un digitalizador de alta frecuencia de muestreo, y un ordenador con un programa de cálculo para obtener la diferencia entre la excitación y el tiempo de llegada del impulso al transductor receptor así como la disminución relativa de la amplitud de dicho impulso.

Figura 2.

En la figura se observa la variación del tiempo de vuelo en función del tiempo de recogida de datos. Las escalas son relativas. Se aprecia como después de un tiempo de acomodación del cultivo, aparece una curva típica de crecimiento exponencial que se corresponde con lo esperado para el tipo de cultivo y la bacteria inoculada: Staphylococcus epidermidis

Ejemplo de realización de la invención

Ejemplo 1.

Como ejemplo de realización, se puede configurar el sistema con un solo transductor emisor-receptor - Figura 1-. El generador eléctrico de

banda ancha EE emite un pulso estrecho al transductor piezoeléctrico de banda ancha E-R. La señal, tras recorrer el camino entre el transductor y el reflector plano RF pasando a través del recipiente con la muestra líquida, vuelve al transductor convirtiéndose en una señal eléctrica que es tratada en el receptor ER. El receptor ER detecta la diferencia entre el tiempo de salida de la señal eléctrica de excitación y el de llegada de la señal tras recorrer dos veces la distancia transductor-

5

10

reflector. Asimismo es detectado en el receptor el valor del máximo de la señal. Este proceso se repite secuencialmente y de forma automática gracias a un sistema de control y adquisición gobernado por un ordenador PC. Durante todo el proceso de medida, el transductor, el recipiente con la muestra líquida y el reflector están sumergidos en un baño de agua termostatzado con una precisión de al menos 0.01 °C por medio de el sistema de control de temperatura CT.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección del crecimiento de microorganismos en fluidos biológicos y muestras clínicas mediante ultrasonidos **caracterizado** porque consiste en: la medida automática de la velocidad de propagación con una frecuencia central de 5 MHz a través de un recipiente estéril que contiene un medio de cultivo líquido al que previamente se le ha inoculado una muestra clínica de sangre, orina u otro fluido orgánico, donde el recipiente y la muestra líquida han de permanecer a una temperatura controlada y fija, que en condiciones estándar se fija en 35°C, uti-

lizando como configuración de transmisión dos transductores piezoeléctricos enfrentados. Finalmente, el pulso electrónico es procesado después de atravesar el recipiente, calculando por procedimientos digitales la diferencia en tiempo entre la señal de disparo y la llegada de dicho pulso.

2. Procedimiento para la detección del crecimiento de microorganismos en fluidos biológicos y muestras clínicas mediante ultrasonidos según reivindicación 1 **caracterizado** porque utiliza como configuración de transmisión un solo transductor y un reflector enfrentado y paralelo a la superficie de emisión del mismo.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

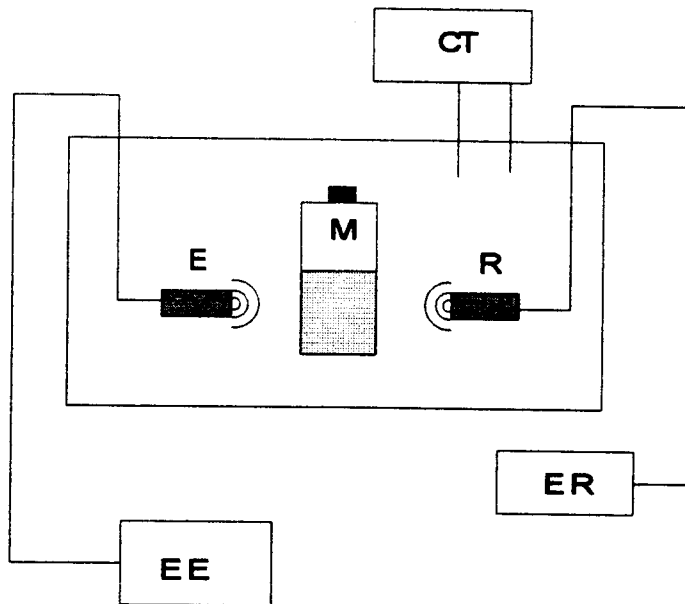


Figura 1

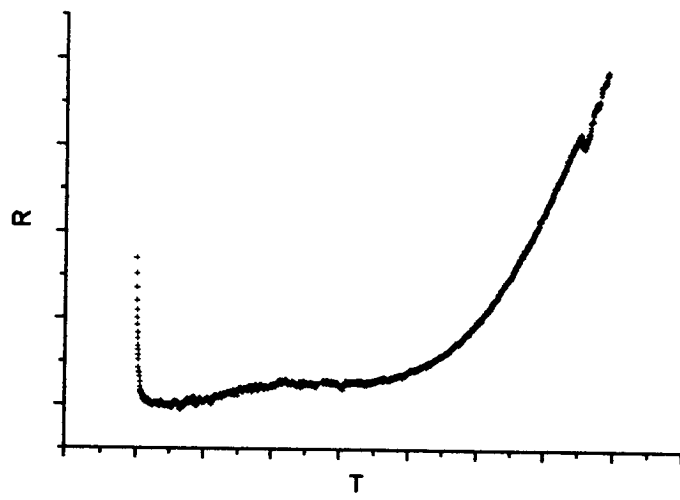


Figura 2

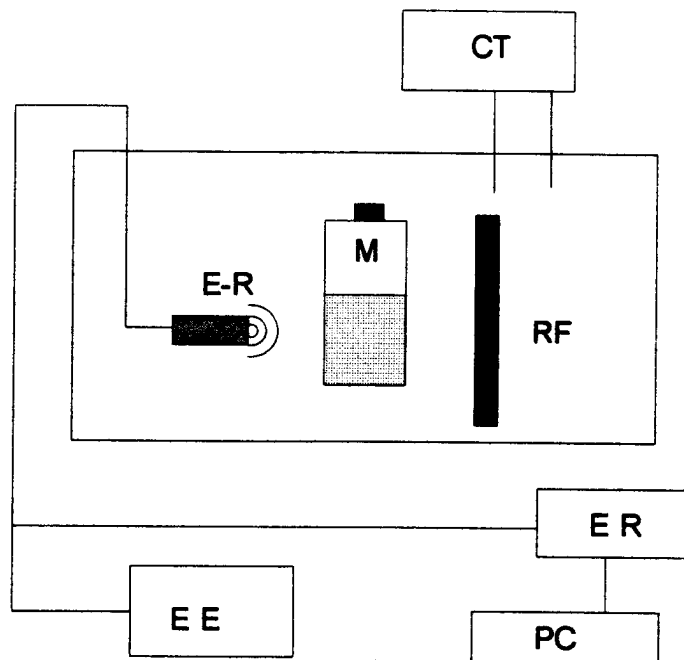


Figura 3



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 147 149
⑫ N.º solicitud: 009802442
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 20.11.1998
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁷: C12Q 1/06

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	DD 229430 A1 (INSTITUT FUER TECHNISCHE MIKROBIOLOGIE) 06.11.1985, página 3, líneas 1-13.	1,2
Y	DD 286873 A5 (TECHNISCHE HOCHSCHULE "CARL SCHORLEMMER"; MARTIU-LUTHER UNIVERSITAET HALLE-WITTENBERG) 07.02.1991, resumen; página 2, líneas 3-6,57-59; reivindicación 8.	1,2
A	BASE DE DATOS WPIL en QUESTEL, semana 199442, Londres: Derwent Publications Ltd., AN 1994-337438, Class C12Q 1/06, JP 06-261793 A (KAWASAKI HEAVY IND LTD), resumen.	1,2
A	BASE DE DATOS PAJ, JP 08-285837 A (KURITA WATER IND LTD) 01.11.1996, resumen.	1,2

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe

29.06.2000

Examinador

A. Cardenas Villar

Página

1/1